

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20766

研究課題名（和文）細胞接着因子Saaの腸管出血性大腸菌感染症の重症化への寄与及び病原性機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the contribution of cell adhesion factor Saa to the severity of enterohemorrhagic Escherichia coli infection and its pathogenic mechanism

研究代表者

窪村 亜希子（Kubomura, Akiko）

国立感染症研究所・細菌第一部・研究員

研究者番号：40947967

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：腸管出血性大腸菌（EHEC）312株を対象にした全ゲノム配列解析を行い、90株から細胞接着因子Saaの遺伝子を検出した。血清型別ではOX18:H19（87.5%）やOX21:H19（81.8%）において高率に検出された。培養細胞を用いた解析では細胞付着性を示したのは7株のみであったが、そのうち2株は溶血性尿毒症症候群（HUS）患者由来株であった。HUS患者由来の2株について追加で解析を行った結果ではsaa含む既知の付着因子以外の未特定の因子が本菌の細胞付着性に寄与していることが示唆され、本研究によりEHEC感染症の重症化に関与する可能性のある新規付着関連遺伝子の存在が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EHECは国内で年間約3000名の感染例報告があり、毎年数名の死者も報告されることから公衆衛生上重要な病原微生物である。また、本菌感染症の発症や重症化には宿主細胞への付着性が重要であることが知られている。本研究により死亡例を含むHUS患者から分離された2株が、未特定の細胞付着因子により培養細胞への付着性を示していることを明らかにした。当該付着因子はEHEC感染症の重症化に寄与している可能性があることから、今後も解析を継続することで付着因子が特定されればEHEC感染症における重症化機構解明の一助になり、また高病原性EHEC株の迅速な分離検出が可能となるため公衆衛生向上にも寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Whole genome sequencing of 312 enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) strains was performed and the gene for cell attachment factor Saa was detected in 90 EHEC strains. By serotype, saa was detected at high rates in OX18:H19 (87.5%) and OX21:H19 (81.8%). Additional analysis of two strains derived from HUS patients suggested that unspecified factors other than known adhesion factors, including saa, contribute to the cell adhesion of this strain. This study indicates the presence of novel adhesion-related genes that may be involved in the severity of EHEC infection.

研究分野：細菌学(含真菌学)

キーワード：腸管出血性大腸菌 細胞接着 全ゲノム配列解析

1. 研究開始当初の背景

食中毒や腸管感染症の原因微生物の1つである腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）は、志賀毒素を産生することから志賀毒素産生性大腸菌（Shiga toxin producing *E. coli*: STEC）とも呼ばれ、国内では年間約3000名の感染例報告があり、ヒトに下痢等の消化器症状を発症させる。同菌による重症例では血便や溶血性尿毒症症候群（HUS）を発症し、毎年数名の死者が報告されることから公衆衛生上の脅威となっている。国内で分離される重症例由来 EHEC の大部分は、病原性遺伝子領域 LEE（locus of enterocyte effacement）を保有する主要7血清群（O157, O26, O111, O121, O145, O103, O165）であることから、EHEC に関する研究はこれら主要血清群と LEE を中心に行われてきた。LEE は、宿主細胞との強固な結合や炎症惹起に寄与する3型分泌装置や分泌タンパク質（エフェクター）をコードすることから、EHEC の感染成立および重症化に重要な因子である。

主要7血清群以外の血清群では LEE を保有しない（LEE-neg）血清群（O74, O113, O115 など）も多く存在し、LEE-neg EHEC による重症例も国内外で報告されるが、主要血清群に比べ十分な研究が行われていないことから病原性や重症化因子等については未だに不明瞭な部分が多く残されている。LEE-neg EHEC のうち O113 については、国外において HUS 発症患者を含む集団感染事例の報告があることや、一部の諸外国では主要血清群として分離されており、また近年多くの海外食品が国内に流通するようになったことから、LEE-neg EHEC について研究を行っていく必要があると考えられる。

2. 研究の目的

EHEC 感染症の重症化と培養細胞への付着性には関連性があることが既に報告されており、2011年にヨーロッパで発生した大規模食中毒の起因菌である LEE-neg EHEC O104:H4 は凝集性付着線毛（Aggregative adherence fimbriae: AAF）を保有していた。国内においても2017年に EHEC 感染症による死亡例から分離された LEE-neg EHEC 株から細胞接着因子 Saa（STEC autoagglutinating adhesin）の遺伝子が検出されている。Saa は2001年に HUS 患者由来 EHEC O113:H21 株から同定された細胞接着因子であることから、LEE-neg EHEC 感染症の重症化に関与している可能性はある。しかし、主要血清群を含む LEE 保有 EHEC からは Saa が全く検出されないことから、十分な研究はされておらず Saa の病原性に関する研究論文は国内外でも希少である。

本研究では EHEC の細胞接着因子のうち Saa に着目し、LEE-neg EHEC 感染症重症化への寄与を解明することで、LEE-neg EHEC のサーベイランス強化に資する。

3. 研究の方法

所内に保管される過去15年分の LEE-neg EHEC 株のうち HUS 患者由来株と同じ O 血清群に属している株を中心に全ゲノム配列（WGS）解析を行い、*saa* を含む病原性関連遺伝子について網羅的に検出を行った。さらに *saa* が検出された株について培養細胞を用いた付着性の解析を実施し、付着性が確認された株のうち HUS 患者由来株を中心に *saa* 破壊株の作製を行うことで、Saa が細胞付着性に寄与している株の特定を行った。HUS 患者由来株についてはマンノース感受性のある Saa 保有株についても検出を行うためマンノース有無の両条件で細胞付着性の解析を行った。さらに完全長ゲノム配列の決定のため PacBio によりロングリードシーケンスを取得し、WGS とハイブリッドアセンブリを実施した。

saa 以外の因子が細胞付着性に寄与している可能性が示唆された場合は、WGS 解析結果から他の既知の付着関連遺伝子保有状況の確認、保有しているプラスミドを非病原性大腸菌株（DH10B）へ導入した株の作製と付着性の解析、および Tn-seq 解析（図1）など追加解析を行い付着因子の特定を試みた。

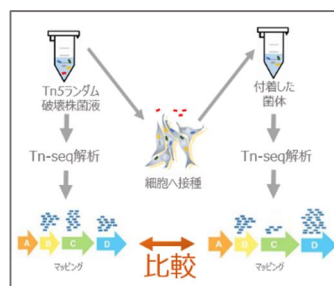


図1. Tn-seq 解析を用いた細胞付着関連遺伝子特定方法の概要

4. 研究成果

LEE-neg EHEC 312 株を対象に WGS 解析を実施した結果、90 株から *saa* が検出され、そのうち8株は HUS 患者由来であった。各血清型の *saa* 検出状況は、国外で集団感染事例として報告がある O113:H21 株においては 78.4% であったが、OX18:H19 (87.5%) や OX21:H19 (81.8%) の血清型の株においても高率で検出されることが確認された。90 株の *saa* 保有 EHEC について、HEp-2 細胞への付着性を解析した結果、細胞付着性を示したのはわずか7株であり、そのうち2株は HUS 患者由来株であった（図2）。HUS 患者由来株についてはマンノース不含による条件でも解析を行ったが、マンノース感受性の Saa は検出されなかった。細胞付着性を示し

た2株のHUS患者由来株について *saa* 破壊株を作製し細胞付着性の解析を行ったが、いずれの *saa* 破壊株も細胞への付着性を示し、さらに当該2株のWGS解析結果では他の既知の付着因子も検出されなかった。また、HUS患者由来株の完全長ゲノム配列の解析により *saa* が存在するプラスミドおよび他のプラスミド保有状況の確認を行い、保有する各プラスミドをDH10Bへ導入した株を作製し、各プラスミド導入株について細胞付着性の解析を行った結果、いずれも細胞への付着性は検出されなかった。

これら解析結果により、2株のHUS患者由来株が示す細胞付着性は、*saa* を含む既知の付着因子以外の未特定の因子が関与し、当該未特定の付着因子はプラスミドではなく染色体上に存在している可能性も示された。染色体上に存在する可能性がある付着因子を特定するため、細胞付着性を示した2株のHUS患者由来株のうち死亡例由来であるOX18:H2株についてTn-seq解析を実施し、取得したシーケンスデータと完全長配列を用いて解析を行った結果、染色体上に存在する約4500種類の遺伝子から本菌の付着性に関与している可能性が高い約30種類の遺伝子を抽出することに成功した。今後、これらの遺伝子に着目して解析を継続していくことにより、本菌の付着因子特定は可能であると考えられる。本研究によりEHECの新規付着因子の存在が示唆され、また本付着因子が死亡例を含むHUS患者由来株の付着性を担っていることから、EHEC感染症の重症化に寄与している可能性があるため、今後も解析を継続し本菌の付着因子特定を行っていくことは重要であると考えられる。

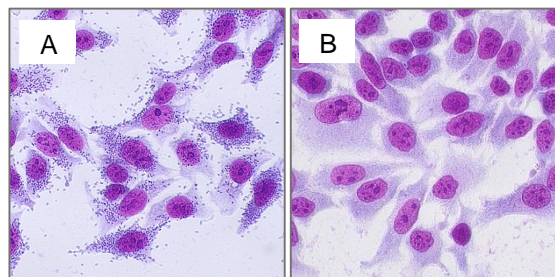


図2. HEp-2細胞による細胞付着性の解析
HUS患者由来の細胞付着性株(A)と非付着性株(B)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kubomura Akiko, Lee Kenichi, Ohnishi Makoto, Iyoda Sunao, Akeda Yukihiko, Working Group EHEC	4. 巻 13
2. 論文標題 Complete genome sequence of eight LEE-negative Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> strains isolated from patients with hemolytic-uremic syndrome	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00591-23	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 窪村亜希子、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏
2. 発表標題 LEE非保有の腸管出血性大腸菌における細胞付着性の解析
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 窪村亜希子、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏
2. 発表標題 LEE非保有の腸管出血性大腸菌の細胞付着性と全ゲノム配列解析
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------